取扱説明書

ReproFF2™

Cat.# RCHEMD006

Version 2.0

本製品をご使用の際は以下の点にご注意ください。

- 継代時は必ず Gentle Cell Dissociation Reagent （GCDR） をご使用下さい。
- 継代時にコロニーサイズを小さくし過ぎないように注意してください。コロニーサイズは 200－300 μm 程度になるようにしてください。
- オンフィーダーあるいはフィーダーレスからの切り替え前の培養を、通常よりも長い 7 日間にして、継代時よりも大きめのコロニーサイズ（500－1000 μm）にしてください。
- ReproFF2™ に移行後、一時的に細胞の状態が悪化する場合がありますが、4 継代ほど培養を続けると状態が安定しますので、継代時の播種量を 1 ： 2 で培養を続けて下さい。
- 細胞の状態は株によって異なりますので、未分化状態が良くない場合は、bFGF の濃度を 10～30 ng/mL にしていただくことで改善する場合がございます。
- オンフィーダー培養から ReproFF2™ に移行後の培養スケジュールは以下のようになります（細胞株によって異なる場合がございます）。

	月	火	水	木	金	土	日
0 週目					FF2 へ		
1 週目	継代 1		MC		継代 2		
2 週目	MC		MC		継代 3		
3 週目	MC		MC		継代 4		

MC:培地交換

製品について

本品は研究用ですので、治療・診断目的には使用しないで下さい。また、本品を当社からの許可なしに第三者への販売や商業目的に使用することを禁じます。

保存方法

本品は冷凍状態で発送されます。到着後すみやかに-20℃で保存して下さい。使用前に解凍し、解凍後は 2～8℃で保存して下さい。小分け保存する場合は、小分け後、-20℃で保存してください。解凍後は 2 週間を目安に使い切って下さい。なるべく凍結融解は繰り返さないで下さい。

特長

- 月、水、金曜日の培養作業で未分化維持が可能です。

推奨スケジュール

- フィーダー細胞は不要です。
- ヒト iPS 細胞 (Takahashi, K., et al., *Cell*, 131, 861-72, 2007) でロット試験済みです。
- 浸透圧、pH、滅菌、マイコプラズマ検査済みです。
- 血清は不含です。

※本製品は 2-Mercaptoethanol を含みます。

使用方法

ReproFF2™ を用いたヒト ES/iPS 細胞の継代方法

別途ご準備いただく試薬類

- 本品：ReproFF2™ に 5 ng/mL bFGF（RCHEOT002, 003）を添加したもの（以下、これらを「ReproFF2™」と総称する）。ヒト ES/iPS 細胞の培養には b FGF の添加が必要です。濃度はご使用の細胞株によって異なる場合がございます。
- Gentle Cell Dissociation Reagent（GCDR）（STEM CELL TECHNOLOGIES, 07174）
- Vitronectin-N（LIFE TECHNOLOGIES, REFA14700）
- PBS (-) : Ca^{++}, Mg^{++}-free PBS
- 60 mm 細胞培養ディッシュ
- P-1000 ピペットマンとチップ
- セルスクレーパー
- その他培養操作に通常必要なもの

＊ GCDR と培地は室温で使用してください。

＊ 本プロトコルではコーティングとして Vitronectin-N の使用を奨励いたします。

＊ コーティング剤は 4℃で使用してください。

＊ Laminin-5 （RCHEOT004）または Corning マトリゲル ヒト ES 細胞最適化マトリックス（Corning)上でも培養可能です。その際のコーティングは各取扱説明書をご参照ください。

目次

A：ディッシュのコーティング方法
B：オンフィーダー培養→フィーダーレス培養への継代方法
C：フィーダーレス培養→フィーダーレス培養への継代方法
D：よくある質問

A：ディッシュのコーティング方法

＜Vitronectin-N の分注＞

A1. Vitronectin-N を室温で解凍します。
A2. 1.5mL チューブに 120 µL ずつ分注します。
A3. 使用時まで、-80℃で保存します。

＜コーティング（60 mm ディッシュ 4 枚分)＞

A4. 分注したチューブを室温で解凍します。
A5. 15 mL チューブに PBS (-) を 8 mL 加えます。
A6. 準備した PBS (-) 8 mL に 120 µL の Vitronectin-N を懸濁し 67 倍希釈液を作ります。
A7. 60 mm ディッシュに 2 mL ずつ加え、全体に行き渡らせます。
A8. 室温で 1 時間静置します。すぐに使用しない場合はパラフィルムでシールし、4℃で保存できます(1 週間を目安にご使用下さい）。

B：オンフィーダー培養→ReproFF2™培養への継代方法

（以下の試薬用量は、60 mm ディッシュの場合です。）

(移行のタイミング)

注１）オンフィーダー及びフィーダーレス培養で、ヒト ES/iPS 細胞のコロニーがディッシュ底面に対して 30%程度を覆うのを目安に継代を行ってください (Fig. 1)。ディッシュ 2 枚分の細胞をまとめてディッシュ 1 枚に移行してください。移行時の細胞数が少ない場合、うまく移行できない可能性が高いのでご注意ください。

注 2）培養日数を通常よりも長めの 7 日間程度未分化維持培養したヒト ES/iPS 細胞をご使用ください。

注３）大きめのコロニーサイズ（500－1000 µm）を用意してください。

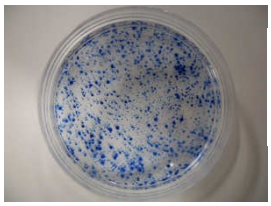

図 1 フィーダーレス培養へ移行時のコロニーの密度の様子。移行時のタイミングのディッシュを ALP 染色したもの。

B1. あらかじめ操作 A でコーティングしたディッシュからコーティング液を取り除き、ReproFF2™を 2 mL 加えておきます。（ディッシュを乾燥させると活性が低下してしまうので、コーティング表面が乾かないようにして下さい。）
B2. フィーダー細胞上で培養しているヒト ES/iPS 細胞（60 mm ディッシュ）から培地を除き、PBS(-) 2 mL で細胞を洗います。
B3. PBS (-) を除去し、GCDR1 mL をディッシュに加え、細胞表面全体に液が行き渡るようにした後、37℃、CO_2 インキュベーターで 3 分程加温します。加温時間はご使用の細胞株、細胞の状態によって異なる場合があります。
B4. 細胞の状態を顕微鏡で観察し、半分以上のコロニーがフィーダー細胞から剥がれかけている状態になっている事を確認します。
B5. GCDR を除去し、PBS (-) 2 mL をディッシュに加え、細胞表面全体に液が行きわたるようにした後、PBS (-) を除去します。
B6. 新しい ReproFF2™ 2 mL を加え、セルスクレーパーでヒト ES/iPS 細胞とフィーダー細胞を全て剥がし 15 mL チューブに回収します。
B7. 再度同じように、新しい ReproFF2™ 2 mL を加え、セルスクレーパーでヒト ES/iPS 細胞とフィーダー細胞を全て剥がし 15 mL チューブに回収します。
B8. 5 mL ディスポーザブルピペットを用いて細胞懸濁液を全量 2 秒以内に吸い上げてください。5 mL ディスポーザブルピペットの先端をチューブの底部に軽く押し当て、1 秒以内に吐き出してください。この操作を **1 回のみ行ってください。**ピペッティング後のコロニーの大きさは **200～300 µm** 程度になっていることが重要です（図 2)。（オンフィーダー培養の継代より大きめに崩します。）

注 4）ピペッティング操作を 2 回以上行いますと細胞が小さくなり過ぎてうまく培養できない場合があります。

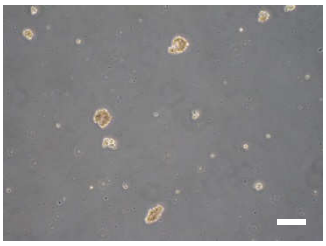

図 2
適切なサイズ（200－300 µm）に崩されたコロニー

スケールバー：250 µm

B9. 細胞懸濁液を全て操作 B1 で準備したディッシュに播種してください。
B10. 細胞が均一になるようにディッシュをゆらし、37℃、CO_2 インキュベーターで培養します。
B11. ReproFF2™に移行後、下記のスケジュールにしたがって培養を行って下さい。

	月	火	水	木	金	土	日
0 週目					FF2 へ		
1 週目	継代 1		MC		継代 2		
2 週目	MC		MC		継代 3		
3 週目	MC		MC		継代 4		

継代 1：コロニーが 1～2mm 程度の大きさになっていますので継代を行って下さい。
MC:培地交換

C：フィーダーレス培養→フィーダーレス培養への継代方法

（以下の試薬用量は、60 mm ディッシュの場合です。）

C1. あらかじめ操作 A でコーティングしたディッシュからコーティング液を取り除き、ReproFF2™を 2 mL 加えておきます。（ディッシュを乾燥させると活性が低下してしまうので、コーティング表面が乾かないようにして下さい。）
C2. フィーダーレス培養中のディッシュから ReproFF2™を除き、PBS (-) 2 mL で細胞を洗います。
C3. PBS(-)を除去し、GCDR をディッシュに 1 mL 加え、細胞表面全体に液が行き渡るようにした後、37℃、CO_2 インキュベーターで 3 分程度加温します。加温時間はご使用の細胞株、細胞の状態によって異なる場合があります。
C4. 細胞の状態を顕微鏡で観察し、半分以上のコロニーがディッシュから剥がれかけている状態になっている事を確認します。
C5. GCDR を除去し、PBS (-) 2 mL をディッシュに加え、細胞表面全体に液が行きわたるようにした後、PBS (-) を除去します。
C6. ReproFF2™を 2 mL ディッシュに加え、セルスクレーパーを用いてコロニーを塊のまま剥がし、5 mL ディスポーザブルピペットを使って 15 mL 遠心チューブに回収します。
C7. 再度同じように、新しい ReproFF2™2 mL を加え、セルスクレーパーでヒト ES/iPS 細胞とフィーダー細胞を全て剥がし 15 mL チューブに回収します。
C8. 5 mL ディスポーザブルピペットを用いて細胞懸濁液を全量 2 秒以内に吸い上げてください。5 mL ディスポーザブルピペットの先端をチューブの底部に軽く押し当て、1 秒以内に吐き出してください。ピペッティング後のコロニーの大きさは **200～300 µm** 程度になっていることが重要です（図 2)。（オンフィーダー培養の継代より大きめに崩します。）

注５）ピペッティング操作を 2 回以上行いますと細胞が小さくなり過ぎてうまく培養できない場合があります。

C9. 操作 C8 で得られた細胞懸濁液のうち半分量を操作 C1 で準備したディッシュに播種してください。オンフィーダー培養からの移行後 4 継代目までは 1:2 の希釈率で継代してください。4 継代目以降、培養が安定した後は 1:3～1:4 の希釈率での継代が可能です。

C10. 細胞が均一になるようにディッシュをゆらし、37℃、5%CO_2インキュベーターで一晩培養します。

C11. 月曜日、水曜日に培地交換を行います。

D：よくある質問

Q1. 継代後、3 日以内にディッシュ底面の 85%以上が細胞で覆われた場合、どうすれば良いですか？

A1. 培養期間はあくまで目安となっております。細胞がディッシュ底面の 85%以上を覆ったタイミングで、培養期間にこだわらず継代を行ってください。

Q2. 継代後にコロニーが小さくなってしまい細胞が増えていないのですが？

A2. 培養期間を延長して様子を見てください。継代時の操作で、コロニーが小さくなった可能性があります。継代時に回収後の細胞をチューブの底部に軽く押し当てずにピペッティングをして播種してください。

Q3. オンフィーダー培養からの移行時にフィーダー細胞を持ち込んでも問題ないですか？

A3. フィーダー細胞は 4 継代繰り返した後には持ち込んだ細胞がほぼいない状態になるので問題ないです。

Q4. オンフィーダー培養から切り替えて継代後に、徐々にコロニー数が減っていますが、どうしたら良いですか？

A4. 培養期間を延長してください。その後継代時に播種する細胞数を１：１にして様子をみてください。それでも上手くいかない場合は、オンフィーダー細胞からの切り替え時のディッシュ枚数を増やして再度行ってください。

株式会社リプロセル
https://www.reprocell.com
E-mail: info_jp@reprocell.com